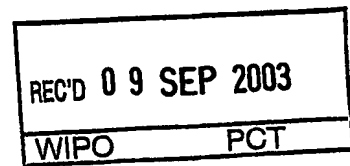


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 36 528.8

Anmeldetag: 9. August 2002

Anmelder/Inhaber: Bayer AG, Leverkusen/DE

Bezeichnung: Vorrichtung und Methoden zur Durchführung von elektrischen Messungen an Membrankörpern

IPC: G 01 N 23/48

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Vorrichtung und Methoden zur Durchführung von elektrischen Messungen an Membrankörpern

Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen und Rezeptoren in Membranen, insbesondere Vorrichtungen und Verfahren zur Durchführung gleichzeitiger elektrophysiologischer Messungen an einem Kollektiv von biologischen Zellen unter Verwendung von Connexinen oder Innexinen.

1. Elektrophysiologische Methoden

Zur Untersuchung der elektrischen Aktivität von Ionenkanälen und Rezeptoren sind dem Fachmann verschiedene Methoden bekannt.

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die Voltage Clamp Methode als eine präzise und verlässliche Methode zur Bestimmung der Aktivität von Ionenkanälen und Rezeptoren in der Membran lebender Zellen etabliert [1, 2]. Dabei wird die zu untersuchende Zelle mit zwei Mikroelektroden, also mit Salzlösung gefüllten spitz ausgezogenen Glaskapillaren, angestochen. Eine Elektrode misst das Potential im Zellinneren, also die über die Zellmembran abfallende elektrische Spannung. Die zweite Elektrode wird verwendet, um einen elektrisch geregelten Stromfluss durch die Zellmembran zu erzeugen. In der Voltage Clamp Anordnung wird dieser Stromfluss so geregelt, dass das Potential über die Zellmembran konstant bleibt (deshalb die Bezeichnung "Voltage Clamp"). Die Größe des durch die Membran fließenden Stroms ist dann ein direktes und sehr genaues und zeitnahes Maß für die Aktivität der in der Zellmembran befindlichen Ionenkanäle, die direkt oder indirekt von Rezeptoren in der Zellmembran aktiviert werden.

Alternativ wird bei der "Current Clamp" Methode der Strom auf einen festen Wert, der oft Null ist, eingestellt, und die nun sich frei einstellende Membranspannung wird gemessen (wozu es bei einer stromlosen Messung nur einer Mikroelektrode bedarf). Dann reflektiert der Wert der Spannung die Aktivität der in der Zelle befindlichen

Rezeptoren und Kanäle, diese Anordnung ist aber nicht so aussagekräftig und präzise wie die Voltage Clamp Methode, weil der Zusammenhang zwischen der Aktivität der Rezeptoren und dem gemessenen Spannungssignal bei der Current Clamp Anordnung in der Regel nicht linear ist, während das gemessene Stromsignal und die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle bei der Voltage Clamp Anordnung direkt proportional sind.

Ein Nachteil der klassischen elektrophysiologischen Voltage Clamp und Current Clamp Verfahren ist, dass sie mit dem Einstich einer Mikroelektrode in die Zelle verbunden sind und damit nur für sehr große Zellen, wie z. B. dem Tintenfischaxon, Muskelzellen, oder Frosch Eizellen geeignet sind. Die Mehrzahl aller Zellen, die für elektrophysiologische Versuche interessant wäre (wie z. B. Nervenzellen, endocrine Zellen, Kulturzellen aller Art) sind viel kleiner und damit für diese Methode unzugänglich. Ein zweiter Nachteil ist, dass diese Methode, wie alle elektrophysiologischen Verfahren, sehr aufwendig ist und manuell von erfahrenen Fachleuten durchgeführt werden muss, so dass man nur wenige Experimente pro Tag durchführen kann und eine industrielle Wirkstoffsuche ("High Throughput Screening oder HTS) damit ausscheidet.

Bekannt ist weiterhin ein Verfahren zur Untersuchung der Öffnungs- und Schließmechanismen von Ionenkanälen in Zellmembranen, das patch clamp Verfahren, das Mitte der 70er Jahre von Neher und Sakmann entwickelt worden ist [3, 4]. Mit dieser Methode wurde die Begrenzung auf große Zellen, der die Elektrophysiologie vorher unterlag, aufgehoben. Es wird eine elektrolytgefüllte Glaskapillare oder Pipette nicht eingestochen, sondern vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt und leicht angesaugt. Dabei bildet sich in der Regel das sogenannte Gigaseal, eine äußerst hochohmige, elektrisch dichte Verbindung zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran. Dies isoliert einen kleinen Membranfleck, den "patch", vom Rest der Zelloberfläche und erlaubt damit, einzelne Ionenkanäle in diesem patch elektrisch zu beobachten. Weiter kann man den "patch" durchsaugen oder elektrisch zerstören und

gewinnt so einen elektrisch hochwertigen Zugang zum Zellinneren, ohne die Zelle sonst zu beschädigen oder gar zu zerstören.

5 Ein Nachteil der patch clamp Methode ist wieder die aufwendige Vorbereitung der Messungen, die auch erfahrenen Elektrophysiologen nur etwa 20 Messungen pro Tag erlaubt. Dies ist weitaus weniger, als für moderne Hochdurchsatzverfahren gefordert wird. Zudem erfordert die konventionelle Patch-Clamp-Technik große Erfahrung und viel Fingerspitzengefühl und ist daher nur bedingt automatisierbar.

10 Bekannt sind außerdem Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen und Firmen, die versuchen, die patch clamp Methode oder eine vergleichbare andere elektrophysiologische Messanordnung so zu automatisieren oder zu parallelisieren, dass sie einen höheren Durchsatz an Messungen erlaubt. Diese Ansätze kann man wie folgt unterteilen:

15 (1) Automatisierung der bisherigen patch clamp Methode mit Glaspipetten, indem einzelne oder alle der aufwendigen manuellen Arbeitsschritte maschinell unter der Steuerung eines Computers ablaufen. Diese Ansätze sind zum Teil vielversprechend und können den Experimentator entlasten und die Anzahl der durchgeführten Messungen damit um einen gewissen Faktor, z. B. zehnfach, erhöhen. Jedoch sind sie alle
20 technisch sehr anspruchsvoll und teuer, und reichen im erzielbaren Durchsatz noch in keinem Fall an die im HTS notwendige Kapazität von vorzugsweise >100000 Tests pro Tag heran.

25 (2) Es werden Konzepte entwickelt, bei denen die patch clamp Pipette durch ein planares oder ein mikrostrukturiertes Substrat ersetzt wird. Zum Beispiel kann es sich dabei um eine Membran oder dünne Folie handeln, die mit kleinen (μm) Löchern versehen worden ist [5, 6, 7]. Die Idee ist, dass Zellen sich an die Löcher anlagern und dort eine Abdichtung ähnlich des Giga-Seals bei der patch Pipette bilden, so dass
30 dann durch das Loch eine ähnliche elektrophysiologische Messung der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran möglich wird. Durch die planare Anordnung und die

grundsätzliche Möglichkeit, in einem Substrat viele Löcher parallel mit Zellen zu belegen, erhofft man sich eine Steigerung des Durchsatzes an Messungen bis in den HTS Bereich hinein. Es werden unterschiedliche Konzepte dieser Art von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt, die sich vor allem in der Auswahl der Materialien für das Substrat und in der Komplexität der Geometrie der Löcher unterscheiden, bis hin zu aufwendigen Strukturen, in denen das Substrat gleichzeitig Kanäle zum Zu- oder Ableiten von Testsubstanzen oder dergleichen umfasst.

Allen diesen Konzepten gemeinsam ist, dass sie bisher noch weitgehend unerprobt sind. In Einzelfällen gibt es Prototypen, bei denen das Anlagern und Abdichten der Zellen gezeigt worden ist. Dennoch ist es zweifelhaft, ob sich die elektrophysiologische Ableitung in einer mit der patch clamp Methode vergleichbaren Qualität auf diesem Wege realisieren lässt. Weiter ist noch völlig unklar, ob sich diese Konzepte in einer für das HTS ausreichenden Weise automatisieren oder parallelisieren lassen.

(3) Eine Sonderweg stellt eine Entwicklung der Bayer AG dar, die zur Zeit von der Firma MCS in Reutlingen in den Markt gebracht wird [8, 9]. Hier werden *Xenopus* Oocyten in 96-er Multiwell Platten gehalten und automatisch mit cDNA injiziert. Mit dieser Anordnung lassen sich automatisierte elektrophysiologische Voltage Clamp Messungen an diesen Oocyten ausführen, so dass die in den Oocyten exprimierten Rezeptoren oder Ionenkanäle einer automatischen Messung zugänglich sind. Damit konnte der Durchsatz an Messungen um etwa das zehnfache gesteigert werden. Diese Methode ist jedoch ausschließlich auf große Zellen, wie *Xenopus* Oocyten, beschränkt und für kleine Zellen, die die überwiegende Mehrheit der Präparate darstellen, nicht geeignet. Der Durchsatz dieser Anordnung an Messungen ist mit den automatisierten patch clamp Methoden vergleichbar, und der für ein HTS notwendige Durchsatz lässt sich auf diesem Wege nicht erzielen. Auch Abbott, Axon, und andere Firmen sind im Begriff, solche Methoden zu entwickeln.

Ein weiterer dem Fachmann bekannter Weg zur elektrischen Messung von Ionenkanälen und Rezeptoren ist der Einbau in künstliche Lipidmembranen [10]. Diese

Verfahren wurden schon in den 60er - 70er Jahren entwickelt und zeichnen sich durch hohen experimentellen Aufwand und geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus, mithin sind sie für eine industrielle Wirkstoffsuche zur Zeit keine Alternative. Interessant sind jedoch neuere Ansätze, eine künstliche Lipidmembran durch ein geeignetes Substrat in der Weise zu stabilisieren, dass sie mechanisch fester, länger haltbar, und reproduzierbarer werden [11]. Voraussetzung für elektrische Messungen an solche stabilisierten künstlichen Membranen ist die Auswahl eines geeigneten Substrats, das gleichzeitig einen guten elektrischen Zugang zu beiden Seiten der Membran erlaubt. Als Substrate finden hier zum Beispiel Silicagele Verwendung, die ggf. zur Verbesserung der Stabilität und Fluidität der Membran mit einer polymeren Zwischenschicht versehen worden sind [12]. Auch können Bilayer auf dem Substrat mit geeigneten Kettenmolekülen stabilisiert werden ('tethered bilayers'), [13].

Diese Verfahren sind zur Zeit noch keine Alternative für ein HTS, insbesondere weil der Einbau funktioneller Rezeptoren oder Ionenkanäle in diese künstlichen Membrane noch nicht reproduzierbar gelingt und für viele Arten von komplexeren Membranrezeptoren grundsätzlich unmöglich zu sein scheint. Es konnten jedoch mit einigen einfacheren Membranproteinen (Gramizidin, Alamethizin, Melittin, Haemolysin), [10] einigen Kaliumkanälen und insbesondere auch Connexinen [14] elektrische Messungen an solchen künstlichen Membranen durchgeführt werden.

2. Connexine, Connexone und Gap Junctions

Dem Fachmann bekannt sind biologische Protein-Moleküle, sogenannte Connexine, welche bei der Kommunikation zwischen lebenden Zellen eine besondere Rolle spielen. Mittlerweile werden etwa fünfzehn verschiedene Connexine aufgrund ihrer Aminosäuresequenz unterschieden [15, 16]. Connexine kommen in allen Vertebraten vor und werden in der Regel mit Abkürzung wie z. B. Cx26 bezeichnet. Hierbei gibt die Zahl die chromatographische Größe der Connexine in kD an. Bekannt sind bislang Connexine mit einem Molekulargewicht zwischen 26 und 56 kD. Alternativ zu dieser Nomenklatur hat sich eine zweite durchgesetzt, die die Connexine anhand von

Strukturmerkmalen in wenigstens 3 Klassen a, b und c einteilt und dann die entsprechenden Connexine in den einzelnen Klassen durchnummeriert.

5 In der Zellmembran lagern sich jeweils sechs Connexine zu einem Connexon zusammen. Ein Connexon ist eine ringförmige Struktur, die die Zellmembran durchquert und grundsätzlich in der Lage ist, einen sehr weiten, unspezifischen Ionenkanal oder eine wassergefüllte Pore zu bilden. Dabei sind diese Poren aber in der Regel geschlossen, solange sich das Connexon in der Membran einer einzelnen, gesunden Zelle befindet. Berühren sich jedoch zwei Zellen, die in ihrer Membran jeweils miteinander kompatible Connexone aufweisen, dann kommt es zwischen zwei Connexonen der gegenüberliegenden Zellen zur Bildung eines Gap Junction Kanals (auch als elektrische Synapse bezeichnet), der nunmehr den Abstand zwischen den Zellmembranen überbrückt. Die Bildung eines Gap Junctions Kanals erfolgt bei Kontakt in der Regel in wenigen Minuten. Der ausgebildete Gap Junction Kanal ist 15 eine Struktur aus in der Regel 12 identischen oder verschiedenen Connexinen, bzw. aus zwei Connexonen. Der Kanal besitzt eine ggf. verschließbare zentrale Pore mit einem Durchmesser von etwa 1,5 bis 2 nm. Der wesentliche Unterschied zu anderen Membrankanälen ist, das Gap Junction Kanäle zwei aneinanderliegende Zellmembranen durchziehen und damit nicht eine Verbindung zwischen dem Zellinneren mit dem Außenmedium, sondern eine Verbindung zwischen den intrazellulären Medien der beiden Zellen herstellen. 20

Dabei ermöglichen Gap Junction Kanäle anorganischen Ionen und kleinen wasserlöslichen Molekülen bis zu einer molekularen Masse von ca. 1000 Dalton den direkten Durchgang von dem Cytoplasma der einen Zelle ins Cytoplasma der anderen Zelle. Damit sind die zwei Zellen sowohl mechanische, elektrisch als auch metabolisch verbunden. Gap Junction Kanäle gehören zu den epithelialen Zell-Zell-Verbindungen und finden sich in nahezu allen Epithelien und vielen anderen Gewebetypen. In der Regel sind viele Gap Junction Kanäle in Form von Feldern organisiert, wobei 30 diese Strukturen dann als Gap Junction im eigentlichen Sinne bezeichnet werden.

Die Gap Junction Kanäle verbundener Zellen sind in der Regel geöffnet und die Connexine gestreckt. Erleidet eine Zelle einen massiven Calciumeinstrom von außen, etwa durch eine Verletzung, so wird die Verbindung zu benachbarten Zellen unterbrochen indem sich die Connexine allosterisch miteinander verwinden.

5

Connexine können verfügbar gemacht werden durch Aufreinigen von Zellmembranen aus Zellen, die Connexine enthalten, z. B. Augenlinse, Herzmuskel, glatte Muskulatur, oder Epithelzellen sowie durch gentechnische Expression der Connexine in Bakterien, Hefen oder anderen Zellen. Es ist weiter bekannt, dass Connexine durch Verbindung mit einem Marker, wie zum Beispiel einem fluoreszierenden Proteinfragment, versehen werden können so dass ihr Vorhandensein in einer Zellmembran mit einfachen optischen Verfahren nachweisbar wird [17].

10

Es sind dem Fachmann Verfahren bekannt, mit denen Connexone in künstliche Membranen oder andere zellfreie Systeme eingebaut werden können. [14]. Diese Connexone und Gap Junctions weisen häufig noch die gleichen Eigenschaften - wie z.B. Porengröße, Ionenselektivität, elektrisches Verhalten - auf, wie in ihrer natürlichen Umgebung. Es ist bekannt, dass es auch zwischen zwei Connexonen, die in künstliche Membranen eingelagert sind, bei Kontakt der Membranflächen zur Ausbildung eines funktionsfähigen Gap Junction Kanals kommt [18].

15

20

Weiterhin ist bekannt, dass Invertebraten eine funktionell ähnliche Klasse von Membranproteinen aufweisen, die Innexine genannt werden [19]. Die hiermit gebildeten Kanäle besitzen allerdings eine größere Pore, die Molekülen bis zu einem Gewicht von 2000 Dalton den Durchgang ermöglicht.

25

Es ist weiterhin bekannt, dass auch in Pflanzen Verbindungen zwischen den Zellen vorkommen, die ähnliche Eigenschaften aufweisen wie Gap Junctions und die als Plasmodesmata bezeichnet werden. Diese überspannen ebenfalls die Zellzwischenwand benachbarter Zellen und ermöglichen ebenfalls einer begrenzten Anzahl von Ionen und kleiner Moleküle die Passage von Zelle zu Zelle. Im Gegensatz zu den

30

Kanälen bei tierischen Lebewesen sind die Plasmodesmata jedoch von der Plasmamembran begrenzt.

5 Ausgehend von dem oben beschriebenen Stand der Technik ergibt sich nun die technische Aufgabe, verbesserte Methoden zur Durchführung elektrochemischer Untersuchungen an Membrankörpern zu entwickeln. Diese Aufgabe wird mit den erfindungsgemäßen Anordnungen und Methoden gelöst, welche im Folgenden beschrieben werden.

10 Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Methoden zur Durchführung von elektrischen Messungen an Membrankörpern, bevorzugt biologischen Membrankörpern. Diese elektrischen Messungen erlauben Rückschlüsse auf den Zustand und auf das Verhalten von membranständigen Biomolekülen, und auf deren Reaktion gegenüber eventuellen Effektormolekülen.

15 Erfindungsgemäße Vorrichtungen enthalten mindestens eine elektrische Messapparatur (1), eine, bevorzugt aber zwei Elektroden (2) und eine Membran (3), in welche biologische Moleküle (4) eingelagert sind, die die gleichen oder ähnliche Eigenschaften haben wie Innexine, Connexine oder Connexone. Bevorzugt sind Innexine, 20 Connexine oder Connexone in die Membran eingelagert. Dabei können jeweils Innexine, Connexine oder Connexone der gleichen Art oder auch Innexine, Connexine oder Connexone verschiedenen Typs in die Membran eingelagert sein.

25 Auf beiden Seiten der Membran befindet sich jeweils eine elektrolytische Flüssigkeit, die bevorzugt Puffereigenschaften hat. Auf der einen Seite der Membran wird bevorzugt eine Flüssigkeit verwendet, welche die für das Überleben von lebenden Zellen notwendigen Eigenschaften hat. Hierzu gehört z.B. eine geeignete Konzentration und Zusammensetzung an Salzen, ein physiologisch verträglicher pH-Wert, ggf. auch das Vorhandensein von Nährstoffen und/oder eine geeignete Konzentration an 30 Sauerstoff.

Die Elektroden sind bevorzugt derart angeordnet, dass sich jeweils eine Elektrode auf jeder Seite der Membran befindet. Die Membran mit den eingelagerten Biomolekülen ist bevorzugt so ausgeführt, dass sie in Abwesenheit von geöffneten Ionenkanälen einen hohen elektrischen Widerstand aufweist.

5

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann für die erfindungsgemäßen Methoden zur Durchführung von elektrischen Messungen an Membrankörpern verwendet werden. Hierfür werden biologische Membrankörper (5) ausgewählt, deren Membran ebenfalls Biomoleküle enthält, welche die gleichen oder ähnliche Eigenschaften haben wie Innexine, Connexine oder Connexone. Bevorzugt sind Innexine, Connexine oder Connexone in die Membran der Membrankörper eingelagert.

10

15

20

25

Besonders bevorzugte Membrankörper, im Sinne der Erfindung, sind lebende Zellen. Diese Zellen exprimieren bevorzugt Connexine oder Innexine. Zellen, die normalerweise keine Connexine oder Innexine exprimieren, können durch Transfektion mit cDNA, mRNA oder eine andere Form geeigneter Sequenzen genetisch, oder durch Einbau von bereits existierenden Connexinen oder Innexinen auf eine andere Weise, derart modifiziert werden, dass die gewünschten Connexine oder Innexine in die Membran der Zellen eingebaut werden und dort bevorzugt genau so funktionieren wie Connexine und Innexine in anderen Zellen. Man wählt vorzugsweise eine stabile Transfektion. Koppelt man die Expression des Connexins, Innexins und/oder des zu untersuchenden Rezeptors bzw. Ionenkanals an die Expression eines fluoreszierenden Proteins (z. B. GFP), so ist eine Vorauswahl von geeigneten Zellen mittels Fluoreszenzspektroskopie möglich. Weisen die verwendeten Zellen bereits Connexine auf, so können diese bei Eignung direkt verwendet werden. Möchte man jedoch einen anderen Typ von Connexinen verwenden, so kann der Einbau endogener Connexine in die Zellmembran durch Zugabe eines geeigneten Oligonucleotides (Cx Antisense Nucleotide) vorübergehend unterdrückt werden.

30

Durch die speziellen Eigenschaften der in die Membran (3) und in die Membrankörper (5) eingelagerten Biomoleküle lagern sich nun bevorzugt Membrankörper über

Gap Junctions (7) an die Membran an. Diese dabei gebildeten Gap Junctions stellen einen elektrischen Zugang von der den Membrankörpern abgewandten Membranseite zum Innern der angelagerten Membrankörper dar.

5 Der Nachweis von funktionsfähigen Gap Junctions kann über elektrische Messungen (Double Voltage Clamp) oder die optische Beobachtung des Transfers von Farbstoffen mit geringem Molekulargewicht (z. B. Lucifer Gelb) erfolgen. Letztere erlaubt die Abschätzung der Kopplung eines Ensembles von Zellen mittels Methoden der Bildverarbeitung.

10

Die erfindungsgemäßen Membrankörper enthalten bevorzugt weitere membranständige Biomoleküle (8) (Targets), deren Eigenschaften durch die erfindungsgemäßen Methoden untersucht werden können. Diese Targets sind bevorzugt Ionenkanäle oder Rezeptoren oder andere Biomoleküle, welche direkt oder indirekt Ladungsbewegungen durch Membranen beeinflussen können.

15

Ladungsbewegungen und/oder Potentialdifferenzen durch die Membran der angelagerten Membrankörper können nun bevorzugt über die beiden Elektroden abgeleitet und quantifiziert werden.

20

Ein besonders bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren ist die Untersuchung der Effekte, die Substanzen auf die zu untersuchenden membranständigen Biomoleküle (Targets) ausüben. Es können so Modulatoren (d.h. Inhibitoren und Aktivatoren des Targets und andere Stoffe, die die Expression des Targets beeinflussen) identifiziert werden. Diese Stoffe sind potentielle Wirkstoffe für die Behandlung von Krankheiten die mit der Funktion des jeweiligen Targets in Zusammenhang stehen.

25

Die Erfindung betrifft weiterhin die mit den erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe sowie Verfahren zu deren Herstellung.

30

"Elektrische Signale", im Sinne der Erfindung, sind physikalische Größen, die mit der Verteilung von elektrischen Ladungen, also Elektronen, Protonen, oder Ionen, im betrachteten System in Zusammenhang stehen. Elektrische Signale, die in erfindungsgemäßen Vorrichtungen aufgenommen werden können sind z.B. die elektrische Stromstärke, die elektrische Kapazität, oder die elektrische Potentialdifferenz sowie Änderungen und Fluktuationen dieser Parameter, wie zum Beispiel Aktionspotentiale.

"Membrankörper", im Sinne der Erfindung, sind von einer Membran umschlossene, mit einer Flüssigkeit gefüllte Volumenelemente. Erfindungsgemäße Membrankörper sind bevorzugt biologische Membrankörper, wie z.B. lebende Zellen. Dazu gehören Zellen, die aus lebenden Geweben durch Dissoziation isoliert wurden (Primärkulturen). Dazu gehören ebenso Zellen, die als etablierte Zelllinien in Kultur gehalten werden, wie CHO-Zellen, HEK-Zellen, NIH3T3-Zellen, HeLa-Zellen aber auch transient transfizierte Zellen oder Primärzellen. Biologische Membrankörper, im Sinne der Erfindung sind außerdem künstlich erzeugte Membrankörper, bei welchen z.B. eine Lipiddoppelschicht ein begrenztes Volumen eines wässrigen Mediums einschließt (Vesikel). Diese Membrankörper enthalten dann vorzugsweise mindestens eine biologische Komponente, z.B. ein in der Lipiddoppelschicht eingelagertes Polypeptid, ein membranständiges Enzym, einen Ionenkanal oder einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Biologische Membrankörper, im Sinne der Erfindung können auch bakterielle Zellen, Pilzzellen oder Zellen anderer einzelliger oder mehrzelliger Organismen sein. Biologische Membrankörper, im Sinne der Erfindung sind, z.B. auch Protoplasten von Pilzzellen und Pflanzenzellen, die durch Entfernen außenliegender Zellwände oder ähnlicher Strukturen erzielt werden. Biologische Membrankörper, im Sinne der Erfindung sind weiterhin auch Membrankörper, die - wie z.B. Synaptosomen - durch Abspaltung oder Vereinigung aus den Membranen von lebenden Organismen erzeugt oder die durch die Vereinigung solcher Präparate mit synthetischen Lipidvesikeln erhalten worden sind.

"Elektrische Messapparatur", im Sinne der Erfindung, ist eine Vorrichtung, die es erlaubt, elektrische Signale aufzunehmen und ggf. zu quantifizieren.

5 Das "Membranpotential" ist die elektrische Potentialdifferenz zwischen den gegenüberliegenden Seiten einer Membran.

10 "Wirkstoffe", im Sinne der Erfindung, sind Stoffe, welche die Aktivität von biologischen Molekülen beeinflussen können. Bevorzugte Wirkstoffe, im Sinne der Erfindung, sind solche, die spezifisch die Aktivität von einzelnen biologischen Molekülen oder von Gruppen von biologischen Molekülen beeinflussen. Besonders bevorzugte Wirkstoffe sind solche, welche die Aktivität von Rezeptoren und/oder Ionenkanälen beeinflussen.

15 "Supported Bilayer" sind Membranen, die sich auf der einen Seite in Kontakt mit oder in unmittelbarer Nähe von einem geeigneten festen, porösen oder gel-artigen Material befinden. Dadurch werden sie gegenüber frei tragenden Membranen mechanisch stabiler und belastbarer.

Die vorliegende Erfindung betrifft

- 20 1. eine Messanordnung zur Messung elektrischer Signale an Membrankörpern enthaltend eine elektrische Messapparatur (1), Elektroden (2), eine Membran (3) enthaltend Connexine oder Innexine (4), und einen Membrankörper (5) ebenfalls enthaltend Connexine oder Innexine (6) dadurch gekennzeichnet, dass ein elektrisch leitender Zugang von der dem Membrankörper abgewandten Membranseite zum Innern des Membrankörpers durch Gap Junction
- 25 Kanäle (7) hergestellt wird.
- 30 2. ein Verfahren zur Messung elektrischer Signale an Membrankörpern dadurch gekennzeichnet, dass eine Messanordnung gemäß Punkt 1 verwendet wird.
3. ein Verfahren nach Punkt 2, wobei das gemessene elektrische Signal

- i) das Membranpotential des Membrankörpers,
- ii) der durch die Membran fließende elektrische Strom, und/oder
- iii) die elektrische Kapazität der Membran ist.

5 4. ein Verfahren zur Auffindung von Wirkstoffen, welche die Eigenschaften von Rezeptoren und/oder Ionenkanälen (8) beeinflussen, dadurch gekennzeichnet, dass

- i) mindestens ein Membrankörper (5) enthaltend besagte Rezeptoren und/oder Ionenkanäle mit mindestens einer Testsubstanz in Kontakt gebracht wird, und
- 10 ii) mindestens ein elektrisches Signal an dem Membrankörper oder den Membrankörpern mit einer Messanordnung gemäß Punkt 1 gemessen wird,

15 wobei diejenigen Testsubstanzen, welche das gemessene elektrische Signal beeinflussen, als Wirkstoffe ausgewählt werden.

20 5. ein Verfahren zum Transport von Stoffen in einen Membrankörper hinein oder aus einem Membrankörper heraus dadurch gekennzeichnet, dass der Stoff durch Gap Junction Kanäle in den Membrankörper hinein oder aus dem Membrankörper herausgelangt. Dabei folgt der zu transportierende Stoff einem elektrischen Potentialgradienten, einem Konzentrationsgradienten, oder einem Druckgradienten über der Membran der erfindungsgemäßen Anordnung

25 6. eine Messanordnung gemäß Punkt 1, wobei besagte Membran als Supported Bilayer ausgeführt ist.

30 7. eine Messanordnung gemäß Punkt 6, wobei besagte Membran als supported bilayer auf einem Substrat aus Silicagel mit einer lipidkompatiblen Polymer-Zwischenschicht, oder als 'tethered bilayer' ausgeführt wird

8. eine Messanordnung gemäß Punkt 1, bei der die Membran das Ende einer Kapillare überspannt.
- 5 9. die Verwendung einer Messanordnung gemäß Punkt 1 als Biosensor zum Nachweis von Stoffen.
- 10 10. die Verwendung von Connexin-dotierten Membranen als Substrat für das Wachstum lebender Zellen in Zellkultur mit der Möglichkeit die elektrische Aktivität der Zellen zu überwachen.
11. die Messanordnung gemäß Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Membran in Form einer lebenden Zelle vorliegt.
- 15 Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Methoden werden weiterhin die durch folgende Ausführungsbeispiele verdeutlicht. Die Ausführungsbeispiele sind lediglich bevorzugte Ausführungen der Erfindung und wirken nicht beschränkend auf den Erfindungsgegenstand.

20 Abbildungen

Figur 1 zeigt eine typische Messanordnung im Sinne der Erfindung mit elektrischer Messapparatur (1), Elektroden (2), einer Membran (3) enthaltend Connexine oder Innexine (4), einem Membrankörper (5), Gap Junction Kanälen (7) und Targets (8).

Beispiel 1

Eine Messanordnung zur Messung elektrischer Signale an Membrankörpern ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Sie besteht aus einer Elektrode (z. B. einer Gold-
elektrode) am Boden einer kleinen Kammer, z.B. einer Kammer in einer Mikroti-
terplatte. Oberhalb der Elektrode ist eine elektrisch dichte künstliche Membran (3)
angebracht, wobei sich im Zwischenraum zwischen Membran und Elektrode eine
Elektrolytlösung als Ionenreservoir befindet. Zusätzlich weist die Messanordnung
eine zweite Elektrode auf, die sich oberhalb der künstlichen Membran befindet. In
die künstliche Membran sind funktionsfähige Hemichannels (Connexone) derart ein-
gebracht, dass sie in der Membran frei diffundieren können und dass ihre normaler-
weise extrazelluläre Domäne sich oberhalb (trans) der Membran befindet. Je nach
beabsichtigtem Vorhaben werden geeignete Connexintypen verwendet. Ggf. werden
Connexone aus mehr als einem Connexin aufgebaut (heteromerische Connexone).
Die Auswahl der geeigneten Connexine erfolgt entsprechend den Anforderungen des
beabsichtigten Tests. Es wird so vorgegangen, dass man ohne Zugabe von den zu
untersuchenden Wirkstoffen ein möglichst kleines elektrisches Signal misst und bei
einer Wechselwirkung der Wirkstoffe mit den zu untersuchenden Ionenkanälen und /
oder Rezeptoren (8) ein möglichst großer Anstieg des beobachteten Signals erfolgt.

Für die Durchführung einer Messung wird in besagte Kammer, welche bereits die
künstliche Membran wie oben beschrieben enthält, eine Suspension mit geeigneten
Zellen hinzugegeben. Diese Zellen (5) weisen in der Zellmembran mindestens einen
zu untersuchenden Ionenkanal oder Rezeptor (8) auf und zusätzlich Hemichannels
(6), die in geeigneter Weise mit den Hemichannels in der künstlichen Membran (4)
der Messanordnung funktionsfähige Gap Junctions (7) ausbilden.

Die Hemichannels in der künstlichen Membran sind zunächst geschlossen, solange
an ihrem Ort keine Zelle aufliegt. Dies wird dadurch sichergestellt, dass über die
Membran eine elektrische Spannung angelegt wird. Beim Kontakt einer Zelle mit der
künstlichen Membran kommt es auch zum Kontakt zwischen Hemichannels in der

künstlichen Membran und der Zellmembran und damit zur Ausbildung von Gap Junctions. Es kann durchaus vorkommen, dass sich zusätzlich Gap Junctions zwischen benachbarten Zellen ausbilden, oder dass manche der Zellen nur indirekt über andere Zellen eine leitende Verbindung zum Ionenreservoir aufbauen. Dies ist
5 aber für die erfindungsgemäße Nutzung dieser Anordnung kein Hindernis. Vielmehr kann sich hierdurch sogar eine Verstärkung des beobachteten Signals ergeben, die die Empfindlichkeit der Messanordnung noch verbessert.

10 Besonderes geeignet für die Messanordnung sind Connexone mit einem Spannungsverhalten derart, dass sie als Hemichannel geschlossen oder als Hemichannel nur bei niedriger Potentialdifferenz (zum Beispiel weniger als 20 mV) über die Zellmembran offen und bei größerer Potentialdifferenz geschlossen sind.

15 Bewirkt nun die Zugabe eines potentiellen Wirkstoffs oder die Reizung durch ein aufgeprägtes elektrisches Signal eine Änderung des Zustandes von Ionenkanälen oder Rezeptoren in der Zellmembran, die wiederum zu einer Änderung des Membranpotentials der Zellen führt, so ergibt sich hierdurch ein Ionenstrom für diejenigen Zellen, die direkt oder indirekt eine leitende Verbindung zum Ionenreservoir unterhalb der künstlichen Membran aufgebaut haben. Dieser Ionenstrom wird ge-
20 messen. Hierfür eignen sich elektrische Messgeräte wie sie dem Fachmann aus typischen elektrophysiologischen Messungen, z. B. Patch-Clamp Messungen, bekannt sind.

25 Als Messergebnis erhält man also ein Stromsignal, das dem gesamten aufsummierten Stromfluss durch die Zellmembranen all jener Zellen entspricht, die über die eingebauten Gap Junctions in leitender Verbindung mit dem Ionenreservoir stehen.

30 Alternativ dazu kann man auch die elektrische Spannung messen und erhält dann ein Spannungssignal, dass das Verhalten der Ionenkanäle und Rezeptoren in eben diesen Zellmembranen in nachvollziehbarer Weise wiedergibt. Damit ist die beschriebene Messanordnung geeignet, das elektrische Verhalten von Ionenkanälen und Rezeptoren

ren direkt und unmittelbar, mit hoher Präzision und guter zeitlicher Auflösung zu bestimmen und auch die Änderungen dieses Verhaltens, die zum Beispiel durch bekannte oder potenzielle Wirkstoffe ausgelöst werden, genau nachzuweisen und zu bewerten. Die Zeitauflösung der Messanordnung wird durch die elektrischen Eigenschaften der Gap Junctions bestimmt, die in ihrer natürlichen Funktion eine Zeitauf-
5 lösung im Sub-Millisekundenbereich aufweisen.

Beispiel 2: Bestimmung der Gesamtmembranfläche

10 Die Entstehung der gewünschten Ableitkonfiguration, bei der die an die am Substrat anliegenden Zellen mittels der Ausbildung von Gap Junctions eine elektrische Verbindung mit dem Ionenreservoir aufnehmen, kann ebenfalls mit elektrischen Messungen überwacht werden. Insbesondere ist mit geeigneten elektronischen Messverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, die elektrische Kapazität der Membran und
15 der über Gap Junctions damit in Verbindung stehenden Membrankörper zu ermitteln. Diese Methode ist geeignet, die Gesamtmembranfläche des Systems zu ermitteln und damit die Anzahl der angelagerten, mit der Membran über Gap Junctions verbundenen Zellen zu bestimmen. Auch kann man dieses Signal zur Bestimmung des Einflusses von Testsubstanzen auf diese Anordnung heranziehen. Insbesondere kann auf
20 diese Weise das Auftreten von Exozytose in den angelagerten Membrankörpern festgestellt werden.

Alternativ wird durch Zugabe eines geeigneten Farbstoffs zu dem Ionenreservoir oder zu den Zellen optisch nachgewiesen, wie viele Zellen eine leitende Verbindung mit dem Ionenreservoir eingegangen sind. Hierfür eignen sich Farbstoffe mit kleinem
25 Molekulargewicht, wie z. B. Luzifer Gelb, die durch Gap Junction Kanäle diffundieren können.

Mit Hilfe der Bestimmung der Anzahl der angelagerten und damit elektrisch verbundenen Zellen kann das gemessene Signal normiert werden, so dass die Ergebnisse
30

verschiedener Versuche mit ähnlichen, aber voneinander abweichenden Versuchsanordnungen direkt verglichen werden können.

Beispiel 3: Parallelisierte Verfahren

5

Der in Beispiel 1 beschriebene Aufbau wird dahingehend modifiziert, dass mehrere oder eine größere Zahl der beschriebenen Kammern nebeneinander eingerichtet werden, dass also zum Beispiel jede Kammer einer Mikrotiterplatte eine Messanordnung gemäß dem Beispiel 1 darstellt. Die einzelnen Messkammern werden sequentiell, in Gruppen oder gleichzeitig ausgelesen. Hierfür können unter anderem Vielkanal-Verstärkersysteme zum Einsatz kommen wie sie aus der MEA (multi-electrode-array)-Technik oder den Detektoren in der Hochenergiephysik bekannt sind.

10

15

Als Mikrotiterplatte werden zum Beispiel solche mit 96, 384, 1536 oder einer beliebigen anderen Anzahl von Kammern verwendet. Damit wird die Messanordnung bevorzugt so gestaltet, dass sie mechanisch und geometrisch mit den bereits in der Wirkstoffforschung etablierten HTS Systemen und Anlagen kompatibel ist, so dass der technischen Anwendung der Erfindung für die praktische Wirkstoffsuche keine Hindernisse entgegenstehen. Bestehende Pipettier- und Dispensiergeräte können dann weiterhin verwendet werden. Lediglich das Detektionssystem wird um ein geeignetes Auslesekopf erweitert, der in der Lage ist die elektrischen Signale aus den Mikrotiterplatten auszulesen.

20

25

Literatur:

1. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley and B. Katz (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch. Sci. Physiol. 3, 129-150.
2. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley and B. Katz (1949). Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London) 117, 500-544

30

3. Neher E. and B. Sakmann (1975) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 779-802
4. Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F.J. Sigworth (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391, 85-100
5. Sigworth, FJ and Klemic, KG (2002) Patch clamp on a chip. *Biophys. J.* 82, 2831-2832
6. Fertig, N., Blick, R.H. and Behrends, J.C. (2002) Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip. *Biophys. J.* 82, 3056-62
10. 7. Rosat, J.-P., Brueggemann, A. and Schmidt, C. (2002) Patch-clamp on a chip - a reality. *Analytica* 2002 p. 4-10
8. Schulz R, S. Bertrand, K. Chamaon, K.H. Smalla, E.D. Gundelfinger and D. Bertrand (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*: Two different types of α subunits coassemble within the same receptor complex. *J. Neurochem.* 74, 2537-2546
15. 9. Decker K. und C. Methfessel (2002) Automatisierte elektrophysiologische Wirkstoffsuche. *Laborpraxis / LabFuture*, s. 72-79
10. Hanke, W. (1985) Reconstitution of Ion Channels. *CRC Critical Reviews Biochemistry* 19, 1-44
20. 11. Sackmann E. and Tanaka M. (2000) Supported Membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications *TIBTECH* 18, 58-64
12. Loidl-Stahlhofen, A., Schmitt, J., Nöller, J., Hartmann, T., Brodowsky, H., Schmitt, W. and Keldenich, J. (2001) Solid-Supported Biomolecules on Modified Silica Surfaces - A Tool for Fast Physicochemical Characterization and High-Throughput Screening. *Advanced Materials* 13, 1829-1834
25. 13. Raguse, B., Braach-Maksvytis, V., Cornell, B.A., King, L.G., Osman, P.D.J., Pace, R.J. and Wieczorek, L. (1998). Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation, and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* 14, 648-659
30. 14. Mazet, J.L., Jarry, Th., Gros, D. and Mazet F. (1992) Voltage Dependence of liver gap-junction channels reconstituted into liposomes and incorporated into planar bilayers. *European Journal of Biochemistry* 210, 249-256

15. Austin, C.D. (1993) The Connexins: A Family of Gap Junction Proteins. *Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine* 10, 133-142
16. Goodenough, D.A., J.A. Goliger, and D.L. Paul (1996) Connexins, Connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65:475-502
17. Jordan K., Solan J.L., Dominguez M., Sia M., Hand A., Lampe P. and Laird D.W. (1999) Trafficking, Assembly, and Function of a Connexin43-Green Fluorescent Protein Chimera in Live Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2033-3050
18. Brewer, G.J. (1991) Reconstitution of lens channels between two membranes. Chapter 19 in: *Biophysics of Gap Junction Channels*, Editor: C. Peracchia, CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, Boston.
19. Phelan, P. (2000) Gap Junction Communication in Invertebrates: The Innexin Gene Family. *Current Topics in Membranes* 49, 389-422

Patentansprüche:

- 5 1. Messanordnung zur Messung elektrischer Signale an Membrankörpern enthaltend eine elektrische Messapparatur (1), Elektroden (2), eine Membran (3) enthaltend Connexine oder Innexine (4), und einen Membrankörper (5) ebenfalls enthaltend Connexine oder Innexine (6) **dadurch gekennzeichnet, dass** ein elektrisch leitender Zugang von der dem Membrankörper abgewandten Membranseite zum Innern des Membrankörpers durch Gap Junction Kanäle (7) hergestellt wird.
- 10 2. Verfahren zur Messung elektrischer Signale an biologischen Membrankörpern **dadurch gekennzeichnet, dass** eine Messanordnung gemäß Anspruch 1 verwendet wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das gemessene elektrische Signal
- i) das Membranpotential des Membrankörpers,
 - ii) der durch die Membran fließende elektrische Strom, und/oder
 - iii) die elektrische Kapazität der Membran ist.
- 20 4. Verfahren zur Auffindung von Wirkstoffen, welche die Eigenschaften von Rezeptoren und/oder Ionenkanälen beeinflussen, **dadurch gekennzeichnet, dass**
- i) mindestens ein Membrankörper enthaltend besagte Rezeptoren und/oder Ionenkanäle mit mindestens einer Testsubstanz in Kontakt gebracht wird, und
 - 25 ii) mindestens ein elektrisches Signal an dem Membrankörper oder den Membrankörpern mit einer Messanordnung gemäß Anspruch 1 gemessen wird,
- 30 wobei diejenigen Testsubstanzen, welche das gemessene elektrische Signal beeinflussen, als Wirkstoffe ausgewählt werden.

5. Verfahren zum Transport von Stoffen in einen Membrankörper hinein oder aus einem Membrankörper heraus **dadurch gekennzeichnet, dass** der Stoff durch Gap Junction Kanäle in den Membrankörper hinein oder aus dem Membrankörper herausgelangt, wobei der Transport des Stoffes durch einen Konzentrationsgradienten, eine elektrische Spannungsdifferenz, oder eine Druckdifferenz angetrieben wird.
6. Messanordnung gemäß Anspruch 1, wobei besagte Membran als Supported Bilayer ausgeführt ist.
7. Messanordnung gemäß Anspruch 1, bei der die Membran das Ende einer Kapillare überspannt.
8. Verwendung der Messanordnung gemäß Anspruch 1 als Biosensor zum Nachweis von Stoffen.
9. Verwendung von Connexin-dotierten Membranen als Substrat für das Wachstum lebender Zellen in Zellkultur mit der Möglichkeit die elektrische Aktivität der Zellen zu überwachen.
10. Messanordnung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Membran in Form einer lebenden Zelle vorliegt.

Vorrichtung und Methoden zur Durchführung von elektrischen Messungen an Membrankörpern

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Anmeldung betrifft eine Messanordnung zur Messung elektrischer Signale an biologischen Membrankörpern bei der ein elektrisch leitender Zugang zum Innern des Membrankörpers durch Gap Junction Kanäle hergestellt wird.

Fig. 1:

